Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen-
und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. T. Brüster

PLASMIN UND PLASMINOGEN BESTIMMUNG MITTELS DES CHROMOGENEN SUBSTRATS S 2251

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Peter Kisly

Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0138

Aus dem Institut für Blutgerinnungswesen-
und Transfusionsmedizin der Universität
Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. H. T. Brüster

PLASMIN UND PLASMINOGEN BESTIMMUNG MITTELS DES CHROMOGENEN SUBSTRATS S 2251

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

P e t e r K i s l y

Düsseldorf
1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der D e k a n
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Arnold

R e f e r e n t

gez.:
Prof. Dr.med. H.Trobisch

K o r e f e r e n t

gez.:
Prof. Dr.med.J.T.Fischer

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung.....1

2. Allgemeines zur Biochemie und Physiologie der Fibrinolyse.....2

2.1.Plasminogen, Physikalisch-Chemische Daten..2

2.2.Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, Plasminogen Aktivatoren.....3

2.3.Hemmstoffe der Plasminogen-Aktivierung.....4

2.4.Plasmin, Physikalisch-Chemische Eigenschaften.....5

2.5.Plasmin Inhibitoren.....5

2.6.Abbau von Fibrinogen und Fibrin durch Plasmin.....6

2.7.Aufgabestellung der Arbeit.....6

3. Materialien.....7

4. Herstellung der Reagenz-Lösungen.....8

5. Methode.....9

5.1.Prinzip.....9

5.2.Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Reaktion.....9

5.3.Erstellung des optimalen Puffersystems.....9

5.4.Enzymsättigung.....10

5.5.Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante für Plasmin.....10

5.6.Bestimmung der Michaelis-Menten Konstante für Sk - PLG - Komplex.....12

6. Ergebnisse.....12

7. Disskusion.....19

Literatur.....24

Zusammenfassung.....27

1. Einleitung

Für die Bestimmung von Plasmin und Plasminogen gibt es eine Reihe von verschiedenen Methoden. Es gibt direkte und indirekte Bestimmungs - Methoden für Plasminogen.

Plasminogen wird als Antigen bestimmt. Mit diesen Verfahren können jedoch keine Aussagen über die Aktivität des Enzyms gemacht werden dh. diese immunologische Methode differenziert nicht zwischen Plasminogen und Plasmin.

Bei den indirekten Methoden muß das Plasminogen zuerst mittels Streptokinase oder Urokinase aktiviert werden und wird dann als Aktivator oder als Plasmin bestimmt. Dieses Verfahren ist sehr empfindlich. Jedoch der hohe Zeitaufwand erlaubt es nicht diese Methode in die Routine - Diagnostik aufzunehmen.

Die Bestimmung des Plasmins durch proteolytischen Abbau des Fibrins oder Caseins als Substrat oder synthetischer Ester durch aktiviertes Plasminogen ist mit vielen Unzulänglichkeiten verbunden (17).

Die Entwicklung der synthetischen chromogenen Substrate, vor allem die Synthese des Substrats S 2160eröffnete eine Fülle von neuen Möglichkeiten in der Enzym - Analytik, besonders auf dem Gebiet der Gerinnung und Fibrinolyse. Die weitere Forschung mit dem Substrat S 2160 ermöglichte die Synthese von einer Reihe neuer, noch sensiblerer und selektiverer Substrate. Das Produkt der Entwicklung ist unter anderen auch das in der vorliegender Arbeit benutzte Substrat S 2251 (13).

UNIV. LEIDEN MED.

2. Allgemeines zur Biochemie und Physiologie der Fibrinolyse.

2.1. Plasminogen, Physikalisch - Chemische Daten

Die physikalisch - Chemische Eigenschaften des Plasminogens sind in erheblichem Masse von der Isolierungs - Methode und Reinheit der Präparate abhängig (10).

Plasminogen ist ein Einketten - Protein, das aus 840 Aminosäuren und einem geringem Kohlenhydrat-Anteil besteht. Das Molekulargewicht beträgt ca. 90 000 Daltons. Die Polypeptidkette besitzt 22 Disulfid - Bindungen. Die N - terminale Aminosäure ist Glutamin - oder Lysinsäure und die C - terminale Aminosäure Asparagin (10).

Elektrophoretisch ist Plasminogen in der Beta $_2$ - Globulin - Fraktion des menschlichen Serums zu finden. Durch Elektrofokusierung gelang es acht Plasminogen Varianten zu trennen und zu isolieren. Alle Varianten besitzen die gleiche spezifische proteolytische Aktivität. Jede der isolierten Varianten hat ein MG 81000 und erscheint in der Polyacrylamidgel - Elektrophorese in Form von zwei Banden. Die verschiedenen Formen des Plasminogens sind vermutlich Isoenzyme, die auch im Plasma und Serum vorkommen. Bedeutend sind aber nur zwei Gruppen von elektrophoretisch unterschiedlichen Plasminogen Formen nämlich die, die als N - Terminale Aminosäure Glutamin oder Lysin besitzen. Alle Isoplasminogene sind durch Urokinase aktivierbar (10).

In human Plasma findet man 15 - 20 mg Plasminogen pro ml. Syntheseort des Plasminogens sind die Leber, eosinophile Zellen des Knochenmarks und die Nieren (Tubulusepithelien) (14,10).

2.2. Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin, Plasminogen - Aktivatoren.

Das Proenzym Plasminogen kann im Körper durch verschiedene physiologische (endogene) und pharmakologischgenutzte (exogene) Aktivatoren in die aktive Protease Plasmin übergeführt werden. Zu den wichtigsten Aktivatoren zählen "Gewebe und Blutkinase", Urokinase, Streptokinase und Staphylokinase.

Plasminogen Aktivatoren sind Enzyme, die die Hydrolyse von niedermolekularen Aminosäuren katalisieren, vorwiegend aber von Lysin - und Argininestern (10).

Eine hohe Aktivator Aktivität findet sich im Uterus, in der Prostata, in den Lungen, Ovarien und den Nebennieren. Im Gegensatz zu der Leber wurden auch Aktivator - Aktivitäten in den Erythrozyten, Leukozyten und den Thrombozyten gefunden (10).

Der Gewebe Aktivator ist an zelluläre Proteine gebunden. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 58000 Daltons. In seinen Eigenschaften ist es sehr der aus menschlichem Harn isolierten Urokinase ähnlich (10).

Der Blut - Aktivator ist im Vergleich zu dem Gewebe-Aktivator und Urokinase sehr labil, was sich in der Erforschung seiner Eigenschaften negativ niederschlägt(10).

Urokinase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 54000 $\pm$ 900 Daltons. Sehr viele Aminosäuresequenzen werden durch Urokinase hydrolysiert. In hoher Konzentration spaltet Urokinase auch Casein. Die Plasminogen - Aktivierung durch Urokinase erfolgt durch die Spaltung einer Arginin - Valin Bindung und weiteren zwei Peptidbindungen im Plasminogenmolekül, wodurch es zur Freisetzung von zwei Peptiden kommt (10).

Streptokinase ist ein Stoffwechselprodukt Beta-hämolysierender Streptokokken. In der Elektrophorese wandert es mit den $Alpha_2$ - Globulinen des menschlichen Serums. Das MG beträgt 5000. Das Molekül besteht aus einer einzigen Polypeptidkette die kein Cystein enthält. Die Aktivierung von Plasminogen mittels Streptokinase verläuft in zwei Phasen. Als erstes wird ein Komplex aus Plasminogen und Streptokinase gebildet, dieser wiederum aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Der Sk - PLG - Komplex spaltet in Plasminogen eine Arginyl - Valin - Bindung und aktiviert dadurch das Plasminogen zur Plasmin. Im Gegensatz zu freier Streptokinase aktiviert der Sk - PLG - Komplex aus menschlicher Plasma auch tierisches Plasminogen. Streptokinase bildet auch mit Plasmin einen Aktivator - Komplex, wobei jedoch die fibrinolytische Aktivität des gebundenen Plasmins verloren geht (10).

Bei einem molekularen Sk - PLG Verhältnis von 1:1 wird die maximale Aktivator - Aktivität erreicht. Die maximale Plasmin - Bildung wird jedoch bei einem 1:10 Sk - PLG Verhältnis erreicht. Die Plasmin Bildung wird mit steigender Streptokinase - Konzentration immer kleiner. Die Stabilität des Aktivator-Komplexes in vitro beträgt bei einer Temp. von 37° C wenige Stunden. Dieses ist zurückzuführen auf die labilen Wasserstoffbrücken und hydrophobe Kräfte, die den Komplex zusammenhalten. Des weiteren wird durch fortschreitende Autolyse der Sk - PLG - Komplex hydrolytisch gestüzt(10).

2.3. Hemmstoffe der Plasminogen - Aktivierung.

Bei den synthetischen Hemmstoffen handelt es sich vorwiegend um Aminosäure - Derivate wie z.B. Epsilon-Aminocapronsäure und 1 - (Aminomethyl) - cyclohexan-4 - Carboxysäure die im klinischem Alltag gebräuchlich sind.

Aprotinin ist ein Polypeptid vom Rind, das außer der Hemmung der Plasminogen - Aktivität auch die Plasmin Wirkung reduziert und in hoher Dosierung als Hemmstoff der Thromboplastin -Aktivität wirkt (10).

Als einzige physiologische Hemmung der Plasminogen-Aktivierung ist das vorkommen von Streptokinase - neutralisierenden Antikörpern gesichert (10).

2.4. Plasmin, Physikalisch - Chemische Eigenschaften.

Plasmin ist eine Endopeptidase, die ähnliche Eigenschaften wie Trypsin besitzt. Sie spaltet Lysyl - Lysin und Lysyl - Arginin Bindungen. Als eine unspezifische Protease baut Plasmin hauptsächlich Fibrin, Fibrinogen aber auch des Faktor V und VIII ab. In vitro werden außerdem noch Casein, Gelatine und Protamin - Komplexe neben Fibrin und Fibrinogen als Substrate für die Plasmin Bestimmung eingesetzt (10).

Plasmin besteht aus zwei Polypeptidketten von denen die schwere Kette ein MG von 48000 und die leichte ein MG von 27500 hat. Beide Ketten sind durch eine Disulfid - Brücke miteinander verknüpft. Die Disulfid - Bindung ist die Voraussetzung für die enzymatische Aktivität des Plasmins. Mit ihrer Lösung z.B. durch Mercaptoäthanol in 8 molaren Harnstoff - Lösung bei pH 9,0 geht die enzymatische Wirkung des Plasmins verloren (10).

Elektrophoretisch ist Plasmin in der $Beta_1$ - Globulin Fraktion des Plasmas zu suchen. Der Isoelektrische-Punkt von Plasmin liegt bei pH 6,2 (10).

2.5. Plasmin Inhibitoren.

Im human Plasma gibt es eine Reihe verscheidene Inhibitoren die die Plasmin Aktivität beeinflussen. Das mit den $Alpha_2$ - Globulinen wandernde $Alpha_2$ - Makroglobulin (MG 800 000) gehört zu den schnell

wirkenden Plasmin Hemmern (14). Noch schneller wird die Plasmin Aktivität durch das $Alpha_2$ - Antiplasmin unterdrückt. Dieses Antiplasmin ist verschieden von $Alpha_2$ - Makroglobulin. Es ist spezifisch für Plasmin (8, 9).

$Alpha_1$ - Antitrypsin (MG 60 000) entfaltet seine Antiplasmin Wirkung in einer langsam fortschreitenden Reaktion. Es bildet 90% der Antiprotease Aktivität das Plasmas. Außer Plasmin hemmt es noch die Aktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Weitere Plasmin Inhibitoren sind Inter Alpha Trypsin-Inhibitor, Antithrombin III - Heparin - Komplex und der C - 1 - Esterase Hemmer (10, 8).

In vitro wird Plasmin noch von niedrigen Konzentrationen von Soja - Bohnen - Trypsin - Inhibitor (SBTI) und von Hirudin gehemmt. Sk - PLG - Komplex wird in vitro durch SBTI und Hirudin nicht gehemmt (11).

2.6. Abbau von Fibrinogen und Fibrin durch Plasmin.

Fibrinogen wird durch die Abspaltung von Peptiden vom C - terminalen Ende der Alpha (A) - Kette und der Beta (B) - Kette zu dem Zwischenprodukt X (FSP-X) abgebaut. Dieses Abbauprodukt ist noch durch Thrombin zur Gerinnung zu bringen. Bei weiterer Proteolyse entstehen über das FSP - Y die FSP - D und FSP - E, die nicht mehr gerinnbar sind. Fibrin wird ebenfals zu den Endprodukten D und E abgebaut. Einen gerinnungshemmenden Effekt hat nur das FSP - Y. Es führt bei der Fibrin - Polymerisation zur Bildung von defekten Gerinnseln (10).

2.7. Aufgabestellung der Arbeit.

Die Zielsetzung der Arbeit ist die Entwicklung einer Methode für die Bestimmung des Plasmins und Plasminogens sowie Erstellung der optimalen Daten für die Kinetik mit dem chromogenem Substrat S 2251.

3. Materialien.

Chromogenes Substrat S 2251:

H-D-Valyl-L-Leucyl-L-p-Nitroanilin Dichlorid
(Kabi/Schweden)

MG 551,5

Löslichkeit größer 40 mmol/L in H_2O
größer 10 mmol/L in Tris Puffer pH 7,5

Km (Humanplasmin) 3×10^{-4} mol/l
Km (Sk - PLG) 2×10^{-4} mol/l

(nach Angaben des Herstellers)

Plasmin:

Lyophilisiertes human Plasmin, 22 nkat (3 CTA U)
Trockensubstanz pro Abfüllung (Kabi/Schweden).

Plasmin Solvent:

10 ml sterile Lösung aus Glycerol + HCl 2mmol/l
(Kabi/Schweden)

Plasminogen:

aus human Serum, lyophilisiert, ca. 20 CTA U
Trockensubstanz pro Abfüllung (Behring Werke AG)

Streptokinase:

5000 IU Trockensubstanz pro Abfüllung
(BEhring Werke AG)

Puffer:

Triäthanolaminhydrochlorid + NaOH 0,1 mol

4. Herstellung der Reagenz - Lösungen.

Herstellung der Plasmin Lösung:

22 nkat (3CTA U) lyophilisiertes Humanplasmin wurden in 10 ml Plasmin - Solvent gelöst was 0,3 CTA U/ml ergab.

Herstellung der Substrat - Lösung

19 mg S 2251 wurden in 2,5 ml Aqua bidset. gelöst, dieses entspricht einer Lösung von 14 mmol/l. Diese Lösung entspricht der Substrat Konzentration CS_1. Aus dieser Lösung wurde dann die Verdünnungs-Reihe wie folgt angesetzt:

CS_1 - 14 mmol/l 1 : 1

CS_2 - 7 " 1 : 2

CS_3 - 3,5 " 1 : 4

CS_4 - 1,75 " 1 : 8

CS_5 - 1,4 " 1 : 10

Bei der Suche nach dem optimalen Puffer wurde eine Substrat - Konzentration von 3,5 mmol/l eingesetzt. Die gleiche Substrat - Konzentration wurde auch bei der Suche nach dem pH Optimum benutzt.

Herstellung der Plasminogen - Lösungen

20 CTA Einheiten wurden in 1 ml Triäthanolamin Puffer bei pH 8,0 gelöst, was einer Konzentration von 20 CTA/ml entsprach. Die 1 : 80 Verdünnung wurde so hergestellt: die primäre Lösung von 20 CTA/ml in 79 ml Triäthanol-amin, pH 8,0 verdünnt. Diese Verdünnung ergab eine Konz. von 0,25 CTA Einheiten pro ml.

1 : 100 Verdünnung: 20 CTA U/ml in 99 ml Puffer verdünnt. Diese Verdinnung entspricht einer Konz. von 0,2o CTA U/ml.

Herstellung der Streptokinase - Lösung

5000 E Streptokinase wurden in 5 ml Triäthanolamin Puffer, pH 8,0 , gelöst, was einer Konz. von 1000 E/ml entspricht.

Für die Sk - PLG - Komplex Bildung wurden folgende Sk/PLG Konzentrations - Verhältnise angesetzt:

5 ml PLG (0,25 CTA/ml) + 0,2 ml Sk (1000 E/ml)

5 ml PLG (0,20 CTA/ml) + 0,2 ml Sk (1000E/ml)

5. Methode

5.1. Prinzip

Plasmin katalisiert die Spaltung des p - Nitroanilin-haltigen Tripeptids S 2251. Das freigesetzte pNA wird bei 405 nm mittels eines Spektralphotometers gemessen. Es wird die Aktivität einer konstanten Plasmin Probe gemessen. Die pro Zeiteinheit freigesetzte pNA - Menge ist der Aktivität des Enzyms proportional.

5.2. Bestimmung der pH - Abhängigkeit der Reaktion

Für die Bestimmung der pH - Abhängigkeit der Reaktion wurde 0,1 molarer Tris - Puffer eingesetzt und zwar in dem pH - Bereich zwischen 9,0 - 6,5

Folgende Test - Ansatz wurde gebraucht:

0,4 ml Puffer (Tris 0,1 mol)
0,4 ml Substrat S 2251 14 mmol/l
0,2 ml Plasmin Lösung 0,3 CTA U/ml

5.3. Erstellung des optimalen Puffersystems

Folgende Puffer wurden untersucht: Tris, Beta - Alanin, Glycin, Triäthanolamin, Diäthanolamin.
Alle Puffer waren 0,1 molar, pH 8,0

Triäthanolamin wurde mit 1 N NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Mit jedem der oben genannten Puffer wurden sechs Messungen durchgeführt.

Folgende Testansatz wurde gebraucht:

0,4 ml Puffer 0,1 mol
0,4 ml Substrat S 2251 14 mmol/l
0,2 ml Plasmin 0,3 CTA U/ml

5.4. Enzymsättigung

Es wird angenommen, daß Enzymaktivität und Enzym-Konzentration direkt proportional sind. Um eine Enzymaktivität als eine Funktion der Enzymkonzentration messen zu können, wird die Substrat - Konzentration relativ zur Enzymmenge im Überschuß der Reaktion zugesetzt.

Wird eine zu niedrige Substrat - Konzentration eingesetzt, ergibt sich eine niedrigere Enzymaktivität (14).

Um die Enzymsättigungs - Kurve zu erstellen, wurde folgendes Experiment gewählt:

0,4 ml Puffer (Triäthanolamin 0,1 mol pH 8,0)
0,4 ml Substrat S 2251
0,2 ml Plasmin 0,3 CTA U/ml

5.5. Bestimmung der Michaelis - Menten Konstante für Plasmin

Die Michaelis - Menten Konstante ist ein Mass für die Affinität zwischen Substrat und Enzym. Je kleiner die Km ist, desto weniger Substrat wird zur Enzymsättigung benötigt, desto größer ist die Affinität des Enzyms zum Substrat.

Die jenige Substrat Konzentration die bei der Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt, wird als Michaelis - Menten Konstante (Km) bezeichnet. Die Dimension der Km ist Mol/l.

Die reziproke Auftragung der Substrat Konzentration in Mol/l auf der Abszisse und den reziproken Wert der Reaktionsgeschwindigkeit V in Delta E/sek auf der Ordinate, ergibt nach Lineweaver und Burk eine Gerade deren Schnittpunkt mit der Ordinate die 1/Vmax und mit der Abszisse -1/Km ergibt (14).

Durch die Gleichung:

$$Km = \tan\alpha \cdot Vmax$$

läßt sich die Michaelis - Menten Konstante in einer linearen Darstellung exakt berechnen.

In dieser Arbeit wurden die Parameter Km und Vmax durch nicht lineare Regression geschätzt. Diese Methode bittet gegenüber der linearisierenden Transformation den Vorteil, daß die Daten nicht transformiert werden müssen, was zur erheblichen Verzerrungen führen kann. Für die Durchführung der nicht linearen Regression wurde das Programm BMDP 3R verwendet (Dr. Richter).

Die Aktivität jeweils einer konstanten Menge von Enzym wurde unter konstanten Bedingungen an verschiedenen Substrat Konzentrationen gemessen.

Für die Bestimmung des Plasmins wurde folgende Konzentrations - Verdunnungs - Reihe des chromogenen Substrats S 2251 hergestellt:

CS_1 - 14 mmol/l

CS_2 - 7 "

CS_3 - 3,5 "

CS_4 - 1,75 "

CS_5 - 1,4 "

Mit jeder dieser Substrat Konzentration wurden zwei Messungen mit folgenden Plasmin Konzentrationen durchgeführt:

0,3	CTA U/ml	1 : 1 Verdünnung
0,2	CTA U/ml	1 : 1,5 "
0,15	CTA U/ml	1 : 2 "

Puffer, Substrat und Plasmin wurden auf 37° C erwärmt. Zur 0,4 ml Puffer wurden 0,4 ml Substrat Lösung S 2251 von der jeweiligen Substrat Konzentration hinzugegeben. Dieser Mischung wurden 0,2 ml Plasmin in einer der oben erwähnten Konzentration beigemischt und die Messung direkt daran angeschlossen.

Die Extinktions Zunahme wurde mittels eines Spektralphotometers bei 405 nm in einem temperierten Küvetthalter gemessem. Das an das Spektralphotometer angeschlossene Signal linearisierender Schreiber, zeichnete eine Gerade aus deren Steigung das Delta E/min abzulesen war.

5.6. Bestimmung der Michaelis - Menten Konstante für Sk - PLG - Komplex.

Alle Reagenzien werden auf 37° C erwärmt. Zu 0,2 ml einer Sk - Lösung die 1000 E/ml enthält wurden 5 ml einer PLG - Lösung mit 0,25 CTA U/ml hinzugegeben. Diese Mischung wird 10 min. bei 37° C in einem Wasserbad zur Aktivierung inkubiert. Danach werden 0,2 ml dieser Mischung zur 0,4 ml Triäthanol Puffer pH 8,0 und 0,4 ml Substrat S 2251 hinzugegeben und die Extinktions - Zunahme Delta E/min bei 405 nm mittels Spektralphotometer direkt gemessen.

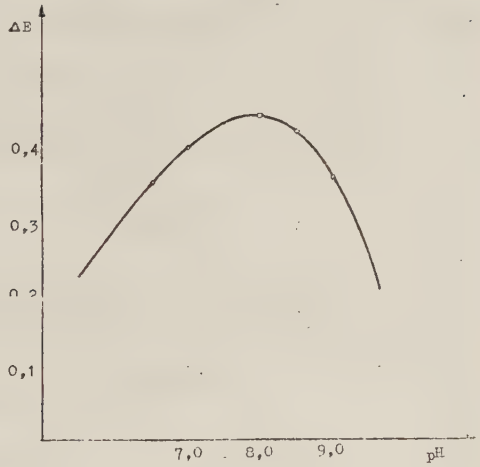
Der gleiche Ansatz wurde mit der PLG - Konzentration 0,2 CTA U/ml durchgeführt.
Alle Messungen erfolgten wie unter 5.5 beschrieben.

6. Ergebnisse.

pH Optimum

Nach einer Reihe von 72 Messungen mit Tris Puffer im pH Bereich zwischen 9,0 - 6,5 zeigt sich, daß das pH Optimum um 8,0 liegt.

pH	$\bar{x}$	s	Vk	n
9,0	0,366	∓ 0,028	7,6	12
8,5	0,426	∓ 0,028	6,6	12
8,0	0,448	∓ 0,028	6,2	12
7,5	0,432	∓ 0,029	6,6	12
7,0	0,409	∓ 0,035	8,6	12
6,5	0,356	∓ 0,031	8,8	12



pH Optimum - Kurve

Puffer Optimum

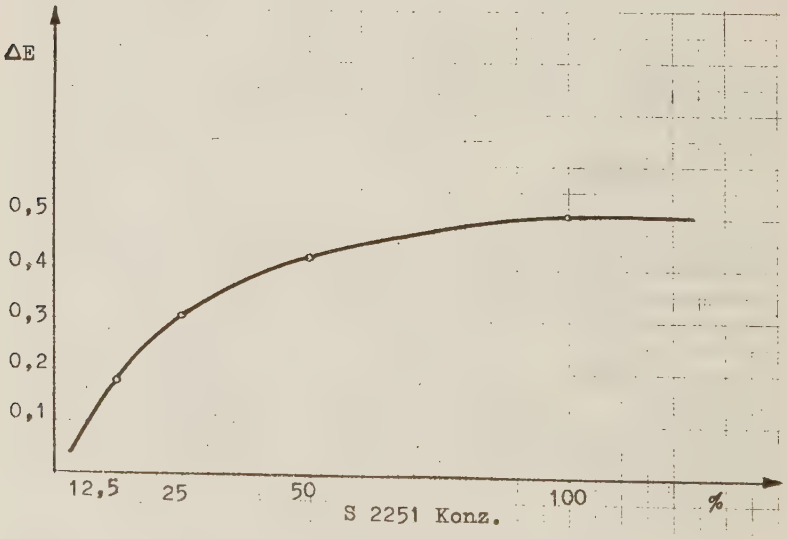
Triäthanolamin pH 8,0 war der Puffer der die höchste Plasmin Aktivität ergab. Auch die Messungen waren hier mit dem kleinsten Fehler reproduzierbar.

Puffer	Mol	$\bar{x}$ ΔE	V $\frac{\mu mol}{ml \cdot min}$	n
Tris	0,1	0,417	0,198	6
Beta - Alanin	0,1	0,364	0,173	6
Glycin	0,1	0,400	0,190	6
Triäthanolamin	0,1	0,425	0,202	6
Diäthanolamin	0,1	0,416	0,198	6

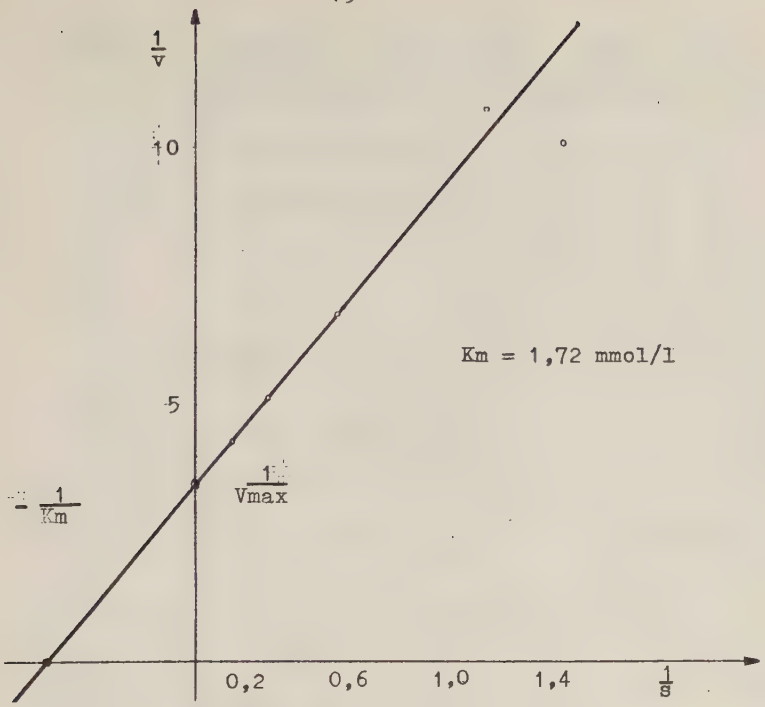
Enzymsättigung

In einer Reihe von 6 Doppelmessungen mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden folgende Werte ermittelt:

S 2251 Konz.	$\frac{mmol}{l}$	$\frac{1}{s}$	$\frac{\Delta E}{min}$	$\bar{x}$	$V \frac{\mu mol}{ml\ min}$	$\frac{1}{v}$
CS_1	7	0,143	0,525 0,475	0,500	0,238	4,201
CS_2	3,5	0,286	0,430 0,390	0,410	0,195	5,128
CS_3	1,75	0,571	0,305 0,315	0,310	0,148	6,757
CS_4	0,875	1,140	0,190 0,195	0,193	0,092	10,870
CS_5	0,7	1,430	0,205 0,210	0,208	0,099	10,101
CS_6	0,35	2,850	0,090 0,090	0,090	0.043	23,255



Substratsättigungs - Kurve



Km nach Lineweaver und Burk

Plasmin Standardisation

Bei der Plasmin Standardisation wurde folgende Reihe von Messungen durchgeführt:

S 2251 Konz.	mmol/l	1/s	ΔE/min	$\bar{x}$	V µmol/ml min
CS_1	14	0,07	0,660 0,660	0,660	0,314
CS_2	7	0,14	0,580 0,560	0,570	0,271
CS_3	3,5	0,28	0,480 0,490	0,485	0,230
CS_4	1,75	0,57	0,380 0,390	0,385	0,183
CS_5	1,4	0,71	0,330 0,330	0,330	0,157
Plasmin Konz. 0,3 CTA U/ml					

Tab. 1

S 2251 Konz	mmol/l	1/s	ΔE/min	$\bar{x}$	v µmol/ml·min	
CS_1	14	0,07	0,285 0,275	0,280	0,133	Tab. 2
CS_2	7	0,14	0,240 0,230	0,235	0,112	
CS_3	3,5	0,28	0,230 0,220	0,225	0,107	
CS_4	1,75	0,57	0,150 0,160	0,155	0,074	
CS_5	1,4	0,71	0,140 0,140	0,140	0,066	
Plasmin Konz. 0,15 CTA U/ml			0,245 0,230	0,240	0,114	Tab.3
			0,175 0,200	0,190	0,090	
			0,170 0,170	0,170	0,080	
			0,160 0,145	0,150	0,071	
			0,115 0,125	0,120	0,057	
			0,220 0,210	0,215	0,102	Tab. 4
			0,180 0,200	0,190	0,090	
			0,165 0,165	0,165	0,078	
			0,130 0,130	0,130	0,061	
			0,105 0,115	0,110	0,052	
Plasmin Konz. 0,2 CTA U/ml			0,410 0,410	0,410	0,195	Tab. 5
			0,360 0,360	0,360	0,171	
			0,280 0,300	0,290	0,138	
			0,230 0,230	0,230	0,109	
			0,220 0,220	0,220	0,105	

Aus diesen ermittelten Daten wurden die Km und Vmax durch die nicht lineare Regression geschätzt(s.b. unter 5.2).

Tab. Nr.	Plasmin Konz. CTA/ml	Vmax	Km
1	0,3	0,723 ± 0,0179	1,649 ± 0,140
2	0,15	0,307 ± 0,0159	1,626 ± 0,289
3	0,15	0,249 ± 0,0182	1,437 ± 0,383
4	0,15	0,236 ± 0,0046	1,523 ± 0,106
5	0,2	0,449 ± 0,0163	1,644 ± 0,205

Gemäß dieser Tabelle ergab sich für die Michaelis - Menten Konstante ein Mittelwert von:

$$Km = 1{,}58 \times 10^{-4} \ (\pm\ 0{,}09\ ) \text{Mol/l}$$

Plasminogen - Streptokinase Komplex Standardisation

Bei der PLG - Sk - Komplex Standardisation wurde folgende Reihe von Messungen durchgeführt: (s.b. S 18.)

Aus diesen hier ermittelten $\bar{x}$ Werten wurden Km und Vmax durch nicht lineare Regression geschätzt(s.b. unter 5.2.).

Tab. Nr.	PLG Konz. CTA/ml	Vmax	Km
1	0,20	0,224 ± 0,113	2,972 ± 0,408
2	0,20	0,196 ± 0,871	2,672 ± 0,337
3	0,25	0,266 ± 0,174	2,597 ± 0,487
4	0,25	0,233 ± 0,864	2,604 ± 0,277

Aus diesen Daten wurde der Mittelwert der Km ermittelt

$$Km = 2{,}71 \times 10^{-4} \ (\pm\ 0{,}18)\ \text{Mol/l}$$

S 2251 Konz.	mmol/l	1/s	E/min	$\bar{x}$	mol/V ml min	
CS_1	14	0,07	0,190 0,190	0,190	0,090	Tab. 1
CS_2	7	0,14	0,150 0,150	0,150	0,071	
CS_3	3,5	0,28	0,120 0,120	0,120	0,057	
CS_4	1,75	0,57	0,090 0,090	0,090	0,043	
CS_5	1,4	0,71	0,070 0,070	0,070	0,033	
PLG Konz. 0,20 CTA U/ml			0,160 0,180	0,170	0,080	Tab. 2
			0,130 0,140	0,135	0,064	
			0,110 0,110	0,110	0,052	
			0,080 0,080	0,080	0,038	
			0,070 0,070	0,070	0,033	
PLG Konz. 0,25 CTA U/ml			0,240 0,230	0,235	0,112	Tab. 3
			0,180 0,180	0,180	0,086	
			0,150 0,150	0,150	0,071	
			0,110 0,110	0,110	0,052	
			0,100 0,100	0,100	0,048	
PLG Konz. 0,25 CTA U/ml			0,200 0,200	0,200	0,095	Tab. 4
			0,160 0,170	0,165	0,078	
			0,130 0,130	0,130	0,062	
			0,100 0,100	0,100	0,048	
			0,080 0,080	0,080	0,038	

Berechnung der Umsatzgeschwindigkeit V des Substrats.

Die Substrats - Umsatzgeschwindigkeit wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E \times V \times 1000}{t \times \epsilon_{\mu mol} \times d \times v}$$

ΔE - Extinktion

$\epsilon_{\mu mol}$ - spezifische mikromolare Extinktionskoeffizient für S 2251 bei 405 nm und 37°C = 10,5 $\frac{cm^2}{\mu mol}$

V - Volumen der Messlösung

v - Volumen der Plasmin bzw. PLG - Probe

d - Schichtdicke der Küvette

$$\text{Volumenaktivität} = \Delta E \times 0{,}476 \frac{\mu mol}{ml \times min}$$

Ein Substratumsatz von 1 $\frac{mol}{min}$ entspricht 1U.

7. Diskussion.

Die Bedingungen der Methode die hier angewandt wurde, wurden in Bezug auf pH, Puffer, Inkubationszeit und Volumen - Verhältnisse optimiert.

Der breite pH - Aktivitätsbereich bei der Plasmin - Aktivitäts Bestimmung mittels chromogenem Substrats des Tripeptids - Typs, wurde auch hier bestätigt (1,2). Es wurde ein pH 8,0 gewählt, da um den pH war die Präzision der Methode am besten.

Bei den Bestimmungs - Methoden für Plasmin oder PLG mit Substraten des Tripeptids - Typs wird Tris Puffer eingesetzt (1,2,3,5,6,18). In unserer Methode wurde Triäthanolamin Puffer benutzt, da die gemessenen

Plasmin - Aktivitäten mit diesem Puffer höher lagen als bei der Verwendung des Tris Puffers bei gleichem pH. Das Volumen des Test - Ansatzes war insgesamt 1ml. Die Mengen - Verhältnise dieses Ansatzes wurden optimiert, in dem die Konz. des Plasmins, Sk, PLG und Substrats zueinander variiert wurden.

Für eine Standard - Methode muss die Linearität des Umsatzes hinsichtlich Zeit und variierter Materialmenge innerhalb bestimmter Grenzen gewährleistet sein (15). Eine konstante Reaktionsgeschwindigkeit wird nur bei hohen Substratkonzentrationen erreicht.Um die optimalen Substratkonzentrationen zu finden, wird die Michaelis - Menten Konstante (Km) ermittelt. Wird die Substrat - Konzentration 10 mal so hoch gewählt wie der Km - Wert, beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit minimal 90% der Vmax. Dies bedeutet, daß der Substratumsatz pro Zeiteinheit während einer Meßzeit von maximal 5` konstant bleibt. Somit liegt hier eine Reaktion nulter Ordnung vor. Als Regel wird angenommen, daß während der Messzeit nicht mehr als ein Fünftel der eingesetzten Substratmenge reagieren soll (14).

Die Km Bestimmungen wurden hier mit hochgereinigtem Plasmin oder PLG - Sk - Komplex durchgeführt und zwar mittels des chromogenen Substrats S 2251.
Unter den von uns ausgearbeiterten Bedingungen ist ein Linearer Umsatz des S 2251 gewährleistet.

Wird Plasmin oder PLG in human Plasma quantitativ bestimmt, muss mit einem Einfluß von einer Reihe verschiedener Inhibitoren oder anderen Enzymen auf die Analyse gerechnet werden. Um diese unerwünschten Störfaktoren zu vermeiden, wurden viele Verfahren entwickelt, durch die die störenden Einflüße so weit wie möglich eliminiert werden konnten. Nach Ansäuerung des Plasmas werden höhere Aktivitäten gemessen als ohne diese Behandlung. Die höheren Aktivitäten sind erstens auf die Änderung der Konformation des PLG - Moleküls, zweitens auf die zerstörerische Wirkung der Säure auf die Plasmin - Inhibitoren zurückzuführen (12).

50% der Plasmin Aktivität in Bezug auf die Spaltungskapazität des S 2251 konnten in vitro durch 0,15 mg/ml eines SBTI (Soja - Bohnen - Trypsin - Inhibitor) gehemmt werden. Eine 98% Hemmung wird erreicht durch Zugabe von 5 mg/ml des SBTI. Die gleiche Menge von PLG, das durch Sk aktiviert wurde, zeigt bei Zugabe von 600 mg/ml SBTI keine Hemmung. Aprotinin jedoch hemmt sowohl Plasmin wie auch durch Sk aktiviertes PLG (2).

Als PLG Aktivator wurde deswegen Streptokinase eingesetzt. Streptokinase und der aequimolare PLG - Sk - Komplex sind ca. zwei mal so effektvoll wie Urokinase (4) d.h. die Spaltungs - Rate des pNA ist bei Sk - Aktivierung des Plasminogens pro Zeiteinheit effizienter.
Die Aktivität des Sk -PLG - Komplexes ist proportional der Konzentration beider Komponenten (11,18).
Ändert man den molaren Verhältnis in Sk zu PLG zugunsten der Sk, wird weniger Plasmin, deswegen mehr des Aktivator-Komplexes: d.h. wenn kleine Mengen von Sk dem menschlichem Plasminogen zugesetzt werden, werden höhere Plasmin Aktivitäten erreicht (2). Wenn Sk in einem großem Überschuß menschlichem Plasminogen zugeführt wird (Sk gleich molar dem PLG oder höher) wird alles Plasminogen zum Aktivator - Komplex umgesetzt, und es gibt kein "freies PLG" das zum Plasmin umgesetzt werden kann.

Da Plasmin im Plasma durch Antiplasmin gehemmt wird, der Sk - PLG - Komplex jedoch nicht,kann man durch maximale Umwandlung des Plasminogens in den Sk - PLG - Komplex eine quantitative enzymkinetische Bestimmung der Plasminogen Aktivität aufbauen (6,2).

Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß es bei hoher Konzentration von humanem Plasma Substanzen gibt, die die Affinität von Streptokinase zu Plasminogen beeinflußen.
Die Inkubationszeit bei dem Sk - PLG - Komplex ist bei 37° C 10 min. (18). Die Zeit kann jedoch auf 3 min. verkürzt werden, wenn man die Inkubationstemperatur auf 42° C erhöht (6,2).

Es wurden eine ganze Reihe von neuen Substraten des Tripeptids - Typs getestet, um ein spezifisches, empfindliches und gut lösliches Substrat für die Plasmin und Plasminogen Bestimmung zu finden (1).
Um eine hohe Bestimmungsgenauigkeit und eine möglichst niedrige Erfassungsgrenze zu gewährleisten, müssen synthetische, chromogene Substrate die folgenden Anforderungen erfüllen:
- sie dürfen nur an einer Stelle gespalten werden
- durch die enzymatische Hydrolyse soll nur ein Farbprodukt entstehen dessen Absorption in einem hohen Wellenbereich liegt
- das farbige Reaktionsprodukt muss einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten aufweisen
- die enzymatische Hydrolyse dieser Substrate muss dem Michaelis - Menten Gesetz folgen
- die Wasserlöslichkeit des Substrates muss mindestens des fünffachen Km - Wert erreichen
- Substratüberschuss soll das zu bestimmende Enzym nicht hemmen
- der Verlauf der enzymatischen Spaltung eines Substrates soll möglichst über einen großen Extinktionsbereich der initialen Hydrolysegeschwindigkeit entsprechen

Sind die genannten Bedingungen für ein Enzym - Substrat-System erfüllt, so ist die bei Substratsättigung in einem Reaktionsgemisch vorliegende Enzymmenge proportional der gebildeten Menge an gefärbtem Produkt (16).

Das hier benutzte Substrat S 2251 ist schon in einer Reihe ähnlicher Arbeiten verwendet und mit L - Lysin als C - terminale Aminosäure und L - Leucin in zweiter Position als relativ spezifisch für Plasmin bzw. PLG erkannt worden (1,3). Außer für Plasmin und Plasminogen wird S 2251 für die Antiplasmin Bestimmung eingesetzt. Es ist im Vergleich mit anderen Substraten dieses Typs selektiver und empfindlicher für Plasmin und Plasminogen. Mengen von Plasmin die kleiner als 10^{-11} mol sind, können

noch mit diesem Substrat erfaßt werden (6,1).
Die niedrige Km und die hohe Löslichkeit ermöglichen es Plasmin bei Substratsättigung zu untersuchen.
Die Methoden die mit diesem Substrat arbeiten benötigen wenig Zeit, sind einfach zu automatisieren und gut reproduzierbar (6,1,3,).

Das Substrat S 2251 ist die Weiterentwicklung des S 2160 das auch für die Plasmin und PLG Aktivitätsmessungen eingesetzt wurde und zwar mit einer sehr guten Empfindlichkeit die aber die schlechte Spezifität und die ungenügende Löslichkeit des Substrates nicht wettmachen konnte (1).
Das Substrat S 2251 ist jedoch nicht monospezifisch. Die gemessene Aktivität von Plasmin im Plasma kann auch von der Anwesenheit andere Enzyme beeinflußt werden. Andereseits ist es aber unwahrscheinlich, daß solch hohe Spiegel von diesen Enzymen im Plasma anwesend sein können, daß sie Einfluß auf die Plasmin Probe haben könnten (3).

Literatur

1. FRIBERGER,P. KNÖS,M.:
Anew specific substrate for the determination of plasmin activity.
in Chromogenic substrates. Ed. VV Kakkar.
Churchill Livingstone, Edinburgh 1978 S. 121-27

2. FRIBERGER,P. KNÖS,M.:
Plasminogen determination in human plasma.
in Chromogenic substrates. Ed. VV Kakkar.
Churchill Livingstone, Edinburgh 1978 S. 128-40

3. LATALLO,Z.S. TEISSEYRE,E. LOPACIUK,S.:
Assessment of Plasma Fibrinolytik System with Use of Chromogenic Substrate.
Haemostasis 7: S. 150-54 (1978)

4. KENNETH,C.ROBBINS. ROBERT,C.WOHL. SUMMARIA,L.:
Catalytic Efficiency of Activation of Human Plasminogen by Various Aktivator Species.
Haemostasis 7: S. 137 (1978)

5. SCULLY,M.F. KAKKAR,V.V.:
Method for the Determination of Plasminogen which descriminates between native and degradet Plasminogen.
Thrombosis Research 12: S. 1201-5 (1978)

6. FRIBERGER,P. KNÖS,M. GUSTAVSSON,S. AURELL,L. CLAESON,G.:
Methods for Determination of Plasmin, Antiplasmin and Plasminogen by Means of Substrate S 2251.
Hämostasis 7: S. 138-45 (1978)

7. GERHARD,W.E. PLAUT.:
p - Nitrobenzyl p - Toluenesulfonyl - L - Arginine: a Chromogenic Substrate for Thrombin, Plasmin and Trypsin.
Hämostasis 7: S.105-8 1978

8. EDY,J. DE COCK,F. COLLEN,D.:
Inhibition of Plasmin by normal and Antiplasmin-dipleted human Plasma.
Thrombosis Research 8: S.513-18 (1976)

9. TEGER-NILSSON,A.C. FRIBERGER,P. GYZANDER,E.:
Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 37: S.403-9 (1977)

10. WITT,I.
Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse.
Verlag Chemie, Weinheim 1975

11. LATALLO,Z.S. TEISSEYRE,E. RACZKA,E.:
Activators of plasminogen, measurement using chromogenic substrates.
in Chromogenic Substrates Ed. VV Kakkar.
Churchill Livingstone, Edinburgh 1978 S.154-64

12. MUSSONIL,L. RACZKA,E. CHMIELEWSKA,J. DONATI,M.B. LATALLO.Z
Plasminogen Assay in Rabbit, Rat and Mouse Plasma using the chromogenic Substrate S 2251
Thromb. Res. 15: S.341-49 (1979)

13. CLAESON,G. AUREK,L. KARLSSON,S. at al:
Design of chromogenic peptide substrates in Chromogenic Substrates Ed. VV Kakkar.
Churchill Livingstone, Edinburgh 1978 S.20-31

14. RICHTERICH,R. COLOMBO,J.P.:
Klinische Chemie
Verlag Karger, Basel 1978

15. KNY,L. RICHTER,J.:
Enzymaktivitäts - Bestimmungen in der Labolatoriums-diagnostik.
Berlin 1977

16. WITT,I:
New Methods for the Analysis of Coagulation Using Chromogenic Substrates.
Berlin 1977 S.27-32

17. COLLIN,E.A.
Dissertation
Düsseldorf 1976

18. SORIA,J. et al:
Dosage du plasminogene a l aide d un substrat chromogene tripeptidique.
Pathologie Biologie 24: S.725 (1976)

Zusammenfassung

Eine Spektralphotometrische Methode für die Bestimmung des Plasmins und Plasminogens mittels des chromogenen Substrats S 2251 wurde ausgearbeitert.

Die Bedingungen für die Kinetik mit dem Substrat S 2251 wurden hinsichtlich pH, Puffer, Inkubationszeit, Temperatur und Volumen - Verhältnisse optimiert.

Unter den ausgearbeiterten Bedingungen ist ein linearer Umsatz des Substrats S 2251 gewährleistet. Die Parameter Km und Vmax wurden durch nicht lineare Regression geschätzt.

Die Plasmin - und Streptokinase - PLG - Komplex Standardisation wurde unter Konstanten Bedingungen durchgeführt.

Als Plasminogen Aktivator wurde Streptokinase eingesetzt. Die Km Bestimmungen wurden mit hochgereinigtem Plasmin oder Plasminogen - Sk - Komplex ermittelt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. Trobisch für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen und der Korrektur.

Herrn Dr. O. Richter aus dem Institut für Medizinische Statistik und Biomathematik gilt mein Dank für seine Unterstützung bei der Auswertung der Meßwerte.

L e b e n s l a u f

K i s l y, Peter geb. am 25. 05. 1950 in Beuthen Oberschlesien/Polen

1957 - 1965 Volksschule
1965 - 1967 Mechanisches Technikum in Beuthen
1967 - 1968 Gearbeitet
1968 - 1971 Mechanisches Technikum in Beuthen (Abendstudium)
1971 Einreise in die BRD
1971 - 1972 Deutsch Sprachkurs am Goethe Institut
1972 - 1974 Sonderlehrgang für Spätausiedler in Duisburg - Hamborn
1974 Abitur
1974 - 1977 Geschichte/Sport Studium an der Universität Bochum
1977 seit SS 77 Studium der Allg. Medizin an der Universität Düsseldorf

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen